

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05969

研究課題名(和文) イヌの新規遺伝性腫瘍の証明とその診断、治療および発生制御に向けた研究

研究課題名(英文) Study on Novel Hereditary Gastrointestinal Cancers in Dogs

研究代表者

平田 暁大(Hirata, Akihiro)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30397327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：純血種のイヌは同じ犬種同士で交配されるため、遺伝性疾患が犬種を超えて広がることは少なく、イヌの遺伝性疾患は特定の犬種に発生することが多い。10年程前から、ジャック・ラッセル・テリア(J.R.テリア)という犬種で消化管(胃や大腸)に腫瘍性ポリープが発生する症例が増加しており、遺伝性疾患ではないかと疑われていた。本研究では、この疾患の症例を集めて遺伝子解析を行い、この疾患が先天的なAPC遺伝子変異を原因とする遺伝性疾患であることを証明した。また、遺伝子検査法を開発するとともに、現在飼育されているJ.R.テリアの1.9%が遺伝子変異を保有していること、他の犬種ではこの疾患はみられないことを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトと同様にイヌやネコにも遺伝性疾患が存在するが、遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常が明らかになっている疾患は少ない。本研究では、消化管腫瘍を発症したJ.R.テリアには特定の遺伝子変異が認められ、この疾患が遺伝性疾患であることを証明した。疾患の原因となる遺伝子変異を特定したことで、本疾患を疑う症例に出合った場合、獣医師は遺伝子検査による確定診断が可能になる。本研究で開発した遺伝子検査法はすでに実用化されている。また、動物の場合、遺伝子変異を保有する個体を繁殖に用いないようにすれば、疾患の発生を制御することができる。

研究成果の概要(英文)：Breed predisposition to certain diseases often provides promising clues to explore novel hereditary disorders in dogs. Since the late 2000s, the prevalence of gastrointestinal (GI) neoplastic polyps in Jack Russell Terriers (JRTs) has increased in Japan. In the present study, we demonstrated that JRTs with GI polyps harbor identical germline variant in the APC gene (c.[462_463delinsTT]) in the heterozygous state and thus this disease is an autosomal dominant hereditary disorder. Next, we developed highly reliable genetic tests for hereditary GI polyposis in JRTs, providing accurate assessment of the presence of the causative germline APC variant. The genotyping assays could contribute to the diagnosis and prevention of hereditary GI polyposis in dogs. Furthermore, using the genotyping assays, we showed that the prevalence of the germline APC variant in JRTs in Japan was 1.9% (15/792) and that hereditary GI polyposis would be breed-specific for JRTs.

研究分野：獣医学

キーワード：遺伝性疾患 イヌ ジャック・ラッセル・テリア 消化管腫瘍 遺伝性消化管ポリポシス 遺伝子検査法 家族性大腸腺腫症 APC遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 純血種のイヌは犬種を維持するために同じ犬種同士で交配されており、遺伝性疾患が犬種を超えて広がることは少ない。そのため、イヌの場合、遺伝性疾患は犬種特異的に発生することが多い。2000年代後半から、日本国内のジャック・ラッセル・テリア（JRテリア）において、消化管に腫瘍性ポリープが生じる症例が増加しており、その犬種特異的な発生から遺伝性疾患である可能性が指摘されていた。しかし、その病態は詳細に検討されておらず、また、遺伝性疾患か否か一切検討されていない。

(2) 遺伝性疾患の確定診断には遺伝子検査が必須である。近年、獣医学領域においても、遺伝子検査が普及しつつあり、遺伝性疾患の診断に用いられている。また、動物の場合、疾患の原因となる遺伝子異常を有する個体を繁殖に用いなければ、疾患が次世代に受け継がれることはなく、疾患の発生制御にも遺伝子検査は重要である。

(3) 遺伝性疾患に対応するためには、疾患がどの程度広がっているのか把握する必要がある。また、上述した通り、イヌの場合、遺伝性疾患は犬種特異的な疾患である場合が多いが、複数の犬種にまたがって発生する疾患も報告されている。そのため、疾患の適切な診断と制御のためには、その犬種特異性について検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、JRテリアの消化管腫瘍性ポリポーシスについて、

(1)-1. 臨床的および病理学的特徴を明らかにする

(1)-2. 疾患の原因となる先天的な遺伝子異常を同定し、遺伝性疾患であることを証明することを主たる目的とした。

さらに、遺伝性疾患であった場合、

(2) 遺伝子検査法を確立する

(3) 疫学調査により疾患の拡がりに明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 消化管ポリープを認めた21頭のJRテリアの臨床的および病理学的特徴を解析した。さらに、本疾患の病態がヒトの家族性大腸腺腫症（FAP）に類似していることに着目し、FAPの責任遺伝子であるAPC遺伝子に生殖細胞系列変異が認められるかPCR-ダイレクトシーケンシング法にて検索した。10頭については血液からDNAを抽出し、APC遺伝子の全域について調べた。血液が入手できなかった11頭については、病理組織学的診断に用いたホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルからDNAを抽出し、APC遺伝子のexon 4について調べた。さらに、腫瘍発生メカニズムを解析するため、JRテリアの消化管腫瘍（未固定凍結サンプルあるいはFFPEサンプル）からDNAを抽出し、APC遺伝子の後天的な異常について検索した。

(2) 遺伝子検査法を確立するため、消化管腫瘍性ポリープのJRテリアにおいて同定されたAPC遺伝子変異を簡便に検出することができるPCR-restriction fragment length polymorphism（PCR-RFLP）法とTaqManリアルタイムPCR法を設計し、遺伝子変異のキャリア犬および非キャリア犬のサンプルを用いて、その有効性を検証した。

(3) 開発した遺伝子検査法を利用して、国内で飼育されているJRテリアにおける現在の遺伝子変異保有状況を解析した。国内の動物病院93施設から792頭のJRテリアの血液を収集し、PCR-RFLP法にてAPC遺伝子変異の有無を検索した。また、JRテリア以外の犬種における本疾患の拡がりを調べるために、消化管上皮性腫瘍の症例を回顧的に収集した。岐阜大学獣医病理学研究室に保管されたFFPEサンプル（19犬種32頭）から抽出したDNAサンプルと麻布大学のゲノムバンクから入手したDNAサンプル（19犬種39頭、JRテリア4頭を含む）を使用し、PCR-RFLP法およびTaqManリアルタイムPCR法にてAPC遺伝子変異の有無を検索した。

4. 研究成果

(1) 消化管ポリープを認めた21頭のJRテリアの臨床的特徴を解析したところ、ポリープの初発年齢は2.3から12.6歳であり、平均7.7歳であった。5歳以下での発生も6頭において認められ、若齢での発症が特徴的であった。ポリープは胃と大腸に発生し、胃では幽門部、大腸では直腸に多く認められた（図1）。21頭中13頭では複数のポリープの発生が認められ（図1左図）、6頭では胃と大腸の両方で発生していた。ポリープの再発は7頭でみられた。臨床症状はポリープの発生部位に依存し、胃のポリープの症例では嘔吐、大腸のポリ-

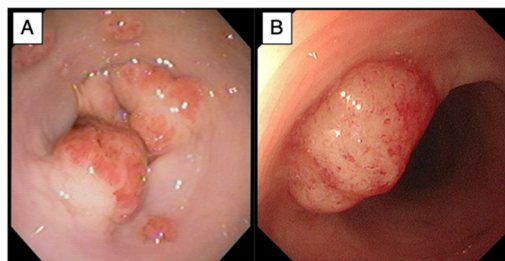


図1. 遺伝性消化管ポリポーシスのジャック・ラッセル・テリアに発生した消化管ポリープの内視鏡像（A：胃幽門部 B：直腸）

プの症例では血便が多く認められた。また、イヌの消化管悪性上皮性腫瘍は予後不良であることが多いが、JR テリアでは1年および2年生存率はともに100% (n=12 および 10)、3年生存率は87.5% (n=8)であった。胃および直腸のポリープは、病理組織学的に上皮性過形成、腺腫、腺癌と診断された。組織型によって腺癌を細分類したところ、管状腺癌、乳頭状腺癌および管状乳頭状腺癌に分類され、イヌで高頻度にみられる印環細胞癌は認められなかった。また、JR テリアの腫瘍は主に胃や大腸の粘膜の上層で増殖し、浸潤性は乏しかった。免疫組織学的解析では、JR テリアの腫瘍において全例で E-cadherin の細胞質および核の陽性像が観察された。

ヒトでは大腸腫瘍の発生を特徴とする遺伝性疾患がいくつか知られている。FAP は、ヒトの APC 遺伝子の生殖細胞系列の変異によって引き起こされる常染色体優性疾患であり、結腸および直腸における多発性の腺腫性ポリープを特徴とする。また、FAP 患者では胃の腺腫および腺癌を発症するリスクが高いことも報告されている。そこで、FAP との病態の類似性に着目し、JR テリアの罹患犬 21 頭の APC 遺伝子変異を検索したところ、全頭で同一の APC 遺伝子変異 (c. [462_463del insTT]) がヘテロ接合性に認められた (図2)。一方、対照として用いた他疾患の JR テリア 6 頭では遺伝子変異は認められなかった (図2)。以上の結果より、本疾患が特定の APC 遺伝子変異を原因とする優性遺伝性疾患であることが明らかとなり、本疾患を「遺伝性消化管ポリポーシス」と名付けた。

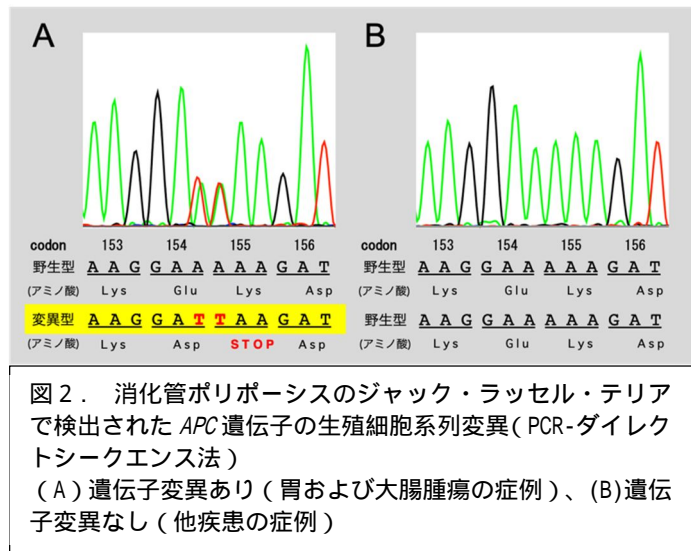


図2. 消化管ポリポーシスのジャック・ラッセル・テリアで検出された APC 遺伝子の生殖細胞系列変異 (PCR-ダイレクトシーケンス法)
(A) 遺伝子変異あり (胃および大腸腫瘍の症例)、(B) 遺伝子変異なし (他疾患の症例)

次に、腫瘍発生メカニズムを解析するため、JR テリアの腫瘍組織の解析を行ったところ、APC 遺伝子において体細胞変異 (n=1) や野生型 APC アレルの消失 (ヘテロ接合性の消失: LOH, n=4) が検出され、FAP 患者と同様に、APC 遺伝子に後天的な異常が加わり、機能的 APC が失われることで腫瘍発生に至ると考えられた。APC タンパク質は E-cadherin の分解に関与しており、機能的な APC の喪失は E-cadherin の蓄積につながることから、この結果は免疫組織学的解析の結果と一致していた。

(2) 遺伝性消化管ポリポーシスの遺伝子診断を可能にするため、同定した APC 変異の有無を正確に判定可能な PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法を開発した。PCR-RFLP 法では、変異部位が制限酵素 Mse I により切断されることを利用して、PCR 産物の切断パターンの違いによって APC 遺伝子変異のキャリア個体と非キャリア個体を識別することが可能であった。また、PCR-RFLP 法では血液、口腔スワブおよびパラフィン包埋組織から抽出した DNA を利用可能であったことから、様々なサンプルに適用可能な汎用性が高い検査法であることが明らかとなった。TaqMan リアルタイム PCR 法では、野生型および変異型アレルに特異的に結合するプローブを用いることで両者を識別することが可能であった。PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法のいずれの方法においても、偽陽性および偽陰性は検出されず、今回開発した検査法は高い特異性と感度を有する信頼性の高い遺伝子検査法であることが実証された。

(3) 開発した PCR-RFLP 法を用いて、国内の JR テリアにおける APC 遺伝子変異の保有状況を調査したところ、792 頭中 15 頭で APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が認められ、その保有率は 1.9% であった。性別、被毛の種類による有意な差は認められなかった。生まれた年を 5 年ごとに区切り (2006-2010 年、2011-2015 年、2016-2020 年) 解析したところ、各年代の APC 変異保有率はおよそ 2% で推移しており、大きな変動は認められなかった。さらに、血統書を用いて、本調査で発見された 8 頭を含め、APC 遺伝子変異のキャリア個体 13 頭の血縁関係を調べたところ、独立した 3 つの家系が見出され、さらにいずれの家系にも属さない個体も認められた。したがって、本疾患の原因となる APC 遺伝子変異は国内の JR テリアにおいて、特定の家系にとどまらず広く拡散していると考えられた。

また、他犬種の消化管腫瘍の症例を調べた回顧的な解析では、ゲノムバンクに含まれていた 3 頭の JR テリアに APC 変異が検出されたが、JR テリア以外の犬には生殖細胞系 APC 変異体キャリアは認められなかった。これらの結果から生殖細胞系 APC 変異体 (c. [462_463del insTT]) を原因とする遺伝性消化管ポリポーシスは JR テリアにおける犬種特異的疾患であると考えられた。

本研究の結果から、近年、日本国内の JR テリアにおいて増加している消化管ポリポーシスは、特定の APC 遺伝子変異 (c. [462_463del insTT]) に起因する遺伝性疾患であることが明らかとなった。さらに、本疾患は JR テリアに特異的な疾患である可能性が高く、国内の JR テリアにおいて APC 遺伝子変異は広く拡散していることが明らかとなった。また、今回開発した遺伝子検査法は、小動物の診療における犬の遺伝性消化管ポリポーシスの診断に役立つばかりでなく、繁殖段階での疾患の発生制御にも役立つと考えられる。伴侶動物の遺伝性疾患は動物と飼い主の

双方に不幸をもたらす。獣医療とその関連事業が充実していく中で、本研究の成果が遺伝性疾患の減少につながれば本望である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshizaki Kyoko, Hirata Akihiro, Nishii Naohito, Kawabe Mifumi, Goto Minami, Mori Takashi, Sakai Hiroki	4. 巻 42
2. 論文標題 Familial adenomatous polyposis in dogs: hereditary gastrointestinal polyposis in Jack Russell Terriers with germline APC mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 70 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizaki Kyoko, Hirata Akihiro, Matsushita Hiroyuki, Nishii Naohito, Kawabe Mifumi, Mori Takashi, Sakai Hiroki	4. 巻 17
2. 論文標題 PCR-based genotyping assays to detect germline APC variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis in Jack Russell terriers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12917-020-02731-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoko Yoshizaki, Akihiro Hirata, Naohito Nishii, Mifumi Kawabe, Takashi Mori, Tokuma Yanai and Hiroki Sakai
2. 発表標題 Gastrointestinal Polyps in Jack Russell Terriers with Germline Mutation of APC Gene
3. 学会等名 Joint European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田 暁大、吉崎 響子、西飯 直仁、川部 美史、森 崇、柳井 徳磨、酒井 洋樹
2. 発表標題 イヌの遺伝性消化管腫瘍の同定
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

イヌの新たな遺伝病を発見：ヒトの家族性大腸腺腫症に類似したイヌの遺伝性腫瘍を発見
<https://www.gifu-u.ac.jp/news/research/2020/05/entry27-7979.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	阪口 雅弘 (Sakaguchi Masahiro) (20170590)	麻布大学・獣医学部・教授 (32701)	
研究 分 担 者	川部 美史 (Kawabe Mifumi) (20635875)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------